

09 926661

31.05.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 27 JUL 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 5 月 3 1 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 1 5 1 7 6 9 号

出 願 人

Applicant (s):

三菱化学株式会社

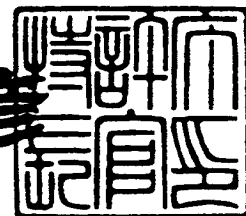
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 6 月 2 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 5 1 9 5 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 99183M

【提出日】 平成11年 5月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 H G F 凍結乾燥製剤

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県鹿島郡波崎町砂山 1 4 三菱化学株式会社鹿島事業所内

【氏名】 千葉 雅俊

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9805687

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 H G F 凍結乾燥製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 肝実質細胞増殖因子、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL以下の濃度で含有し、注射剤として望ましい pH 及び浸透圧を有する水溶液を調製するための製剤。

【請求項 2】 肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL以下の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥して得られる請求項 1 に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 3】 安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である請求項 1 又は 2 項に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 4】 安定化剤がアルギニン、リジン、デキストラン硫酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 5】 緩衝剤がリン酸塩である請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 6】 さらに界面活性剤を含有する請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 7】 界面活性剤が非イオン性界面活性剤である請求項 6 に記載の凍結乾燥製剤。

【請求項 8】 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である請求項 7 に記載の凍結乾燥製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肝実質細胞増殖因子を含有する凍結乾燥製剤に関する。

【従来の技術】

肝実質細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : 以下、本明細書において「HGF」と略す場合がある。) は肝実質細胞の増殖活性を有するタンパク質であり、種々の動物種においてその存在が知られており、異なったアミノ酸配列を有するものが報告されている。ヒト肝実質細胞増殖因子 (以下、本明細書において「hHGF」と略す場合がある。) は、大工原らにより劇症肝炎患者血漿より見出され (特開昭63-22526号公報)、その後、喜多村らによりhHGFタンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子 (cDNA) 配列が明らかにされた (特開平3-72883号公報)。さらにこのcDNAを用いたhHGFタンパク質の生産方法及び形質転換体が報告されるにいたり (特開平3-285693号公報)、hHGFタンパク質の大量生産が可能となり医薬品としての応用が期待されている。

【0002】

hHGFは糖タンパク質の一種であり、分子量は非還元状態では約80~90 KDa、還元状態では約52~56 KDaの α サブユニットと約30~36 KDaの β サブユニットからなるヘテロダイマーである。hHGFは、肝細胞増殖因子としての活性のほか、スキャター因子 (scatter factor ; SF) 活性、腎臓尿細管上皮細胞増殖因子活性、損傷組織修復因子活性、血管内皮細胞増殖因子活性など多様な生物活性を有しており、肝臓疾患治療薬、腎臓疾患治療薬、脳神経障害治療剤、育毛促進剤、創傷治療薬、抗腫瘍治療薬などの医薬としての開発が期待されている。

【0003】

HGFの製剤については、W090/10651公報、特開平6-247872号公報、及び特開平9-25241号公報に記載がある。上記W090/10651公報には、HGFと比較してアミノ酸5残基が欠失したデリーションタイプのHGF (TCF) の水溶液製剤が開示されており、アルブミン、ヒト血清、ゼラチン、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等がTCFを水溶液中で安定化することが教示されている。特開平6-247872号公報には、塩基性アミノ酸等とTCFを共存させることにより、TCFを5~10 mg/mLの高濃度に含有させた製剤が開示されている。この刊行物にはTCFの水溶液での溶解性が言及されており、TCFを高濃度に含有させた水溶液が開示されている。

【0004】

しかしながら、HGFの水溶液製剤は、中性pHにおいて溶解性が急激に低下し、低温又は室温で数日間保存すると凝集、白濁、ゲル化が進行するという問題を有している。また、類縁体・重合体が形成されるなど物理化学的安定性が低く、生物活性が低下するなど製剤安定性が低く、生物学的活性の点からも長期間の保存には適しない。さらに、HGFの水溶液製剤は、振とう攪拌による泡立ち等により凝集、白濁、ゲル化を引き起こし、長期間の保存及び流通運搬の際に製剤品質の低下、薬効の低減がもたらされる。このため、HGFの製剤としては、凍結乾燥製剤が好適である。

【0005】

特開平9-25241号公報にはHGF(TCF)の凍結乾燥製剤が開示されており、クエン酸塩を緩衝液として用い、安定化剤としてグリシン、アラニン、ソルビトール、マンニトール等を用いることにより、長期間にわたり安定なHGF(TCF)凍結乾燥製剤を提供できることが教示されている。しかしながら、この凍結乾燥製剤は、緩衝液としてクエン酸を用いるために再溶解後のpHが6以下の酸性条件であり、また溶液の浸透圧が高いために、注射投与の際の痛み、投与部位での炎症反応、溶血現象を誘起するなどの問題を有している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、HGF凍結乾燥製剤を提供することにある。より具体的には、注射剤として望ましいpHおよび浸透圧比を有しており、かつ凝集、白濁、ゲル化などを生じない保存安定性に優れた水溶液を製造可能なHGF凍結乾燥製剤を提供することが本発明の課題である。また、凍結乾燥時に良好なケーキ形成性を有し、溶解性に優れ、かつ長期保存安定性に優れた凍結乾燥製剤を提供することも本発明の課題である。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HGFの濃度を5mg/mL以下として安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤の存在下で凍結乾燥を行うと、ケーキ形成性、溶解性、長期保存安定性の良好な凍結乾燥製剤を製造す

ることができること、及び該凍結乾燥製剤から注射剤として望ましいpH及び浸透圧を有する水溶液を調製でき、水溶液の保存に際しても凝集、白濁、ゲル化などが生じないことを見出した。また、このように希薄なHGFを含む水溶液が臨床的に十分な薬効を発揮できることも見出した。本発明は、上記の知見を基にして完成されたものである。

【0008】

すなわち、本発明は、HGF、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有するHGF凍結乾燥製剤であって、HGFを5 mg/mL以下の濃度で含有し、注射剤として望ましいpH及び浸透圧を有する水溶液を製造するための製剤が提供される。このHGF凍結乾燥製剤は、好ましくは、HGFを5 mg/mL以下の濃度で含有する水溶液を凍結乾燥することにより製造できる。注射剤として望ましいpHとしては、通常、6.0から7.0の範囲を上げることができ、注射剤として望ましい浸透圧としては、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比(1~2)を上げることができる。

【0009】

本発明の好ましい態様によれば、安定化剤がアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン、プロリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、硫酸化多糖類、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる安定化剤である上記HGF凍結乾燥製剤；安定化剤がアルギニン、リジン、デキストラン硫酸、及びこれらの薬理上許容される塩からなる群から選ばれる上記HGF凍結乾燥製剤；緩衝剤がリン酸塩である上記HGF凍結乾燥製剤；さらに界面活性剤を含有する上記HGF凍結乾燥製剤；界面活性剤が非イオン性界面活性剤である上記HGF凍結乾燥製剤；非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である上記凍結乾燥製剤が提供される。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明の凍結乾燥製剤に含まれるHGFの種類は特に限定されない。例えば、HGFを含有することの知られているヒトやラット等のほ乳動物由来の体液や組織、または自発的にHGFを産生する細胞から天然のHGFを単離してもよいが、

遺伝子組換え法により該増殖因子 cDNA を細胞に導入して得られる組換え HGF を用いてもよい。組換え HGF を産生させる宿主としては、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。具体例には、組換え HGF として、例えば、上記ほ乳動物由来の胎盤、肝障害患者肝組織及び血液、MRC-5 細胞、IMR-9 細胞などの線維芽細胞株、あるいは特開平3-285693号公報に記載された方法に従い hHGF をコードする cDNA を含む発現ベクターを CHO 細胞等の宿主に導入した産生株などから得られたものを挙げるができる。

【0011】

また、HGF としては、シグナル配列を有する蛋白質などの前駆体蛋白質や、肝実質細胞を増殖させる活性を損なわない範囲において一部のアミノ酸を置換、欠失、及び／又は挿入した修飾蛋白質や糖類を欠失又は置換した改変体を用いてもよい。改変体としては、例えば、特開平2-288899号公報、W090/10651号公報、特開平3-130091号公報、同3-255096号公報、同4-30000 号公報、Nature, 342, 440-443(1989)等に記載されたものを挙げるができる。

【0012】

本発明の凍結乾燥製剤に好適に用いられる HGF として、以下の理化学的性質を有する蛋白性因子を挙げるができる。また HGF はヒト由来のものであることが好ましく、特に好ましい HGF として、特開平3-72883 号公報及び特開平4-89499 号公報に記載のアミノ酸配列で表されるものを挙げることができる。

- 1) SDS-PAGE (非還元条件下) による推定分子量が約 76,000～92,000 である、
- 2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有する、及び
- 3) ヘパリンに対して強い親和性を有する。

さらに、好ましい HGF は、上記の理化学的性質に加えて、

- 4) 80℃、10分間の加熱処理により上記活性が失活する、及び
 - 5) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活する、
- を有する。

【0013】

HGFは、中性pHにおいてHGFの等電点（ $pI = 7 \sim 8$ ）と重なるために溶解度が急激に低下するという問題を有している。例えば、140 mM塩化ナトリウムを含有する10 mMリン酸ナトリウム緩衝液（PBS；室温）においてpH 7.0～7.5付近では1.0 mg/mL程度の低い溶解度を示すが、pH 5.0付近では5 mg/mL以上の溶解度を示し、HGFの溶解度は低pH側で高くなる。また、塩化ナトリウム濃度0.14 MではHGFの溶解度は1 mg/mL程度であり、0.3 M以上とするとHGFは5 mg/mL以上の濃度で溶解する。従って、HGFの溶解度を上昇させるためには、pHを5以下の酸性条件とするか、あるいは塩化ナトリウム濃度を0.3 M以上に上げる必要がある。しかしながら、注射液のpHを酸性にし、あるいは塩濃度を高くして注射溶液の浸透圧を高くすると、注射投与の際の痛み、投与部位での炎症反応、溶血現象の原因となるために好ましくない。

【0014】

また、HGF、緩衝剤、及び塩化ナトリウムの3成分を含むHGF凍結乾燥製剤（特開平6-247872号公報又は特開平9-25241号公報に記載のもの：HGF濃度は5～20 mg/mL）において、HGFの沈殿などの問題を回避するためにHGFの含有量を低下させると、凍結乾燥工程において良好なケーキが得られないという問題があり、さらに、上記3成分から得られた凍結乾燥製剤を再溶解した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化が認められ、十分な物理化学的安定性を達成できないという問題もある。従って、凍結乾燥により良好なケーキ形状を与え、かつ長期間の保存安定性に優れた水溶液を製造できる凍結乾燥製剤を調製するためには、ケーキ形成性および水溶液における保存安定性の改善を目的とした添加剤の添加が必須である。

【0015】

本発明の凍結乾燥製剤は、凍結乾燥製剤から製造される水溶液がHGFを5 mg/mL以下の濃度で含むように調製され、得られた水溶液は注射剤として望ましいpHと、生体とほぼ等張又は注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比（1～2）を有し、しかも保存安定性に優れるという特徴を有している。また、凍結乾燥工程により良好な凍結乾燥ケーキを形成することができ、凍結乾燥製剤を再溶解

した水溶液では、凝集、白濁、ゲル化などの問題がなく、十分な物理化学的安定性を達成できるという特徴がある。さらに、臨床適用した場合には、所望の薬理作用を十分に発揮することができる。

【0016】

安定化剤としては、アルギニン；リジン；ヒスチジン；グルタミン；プロリン；グルタミン酸；アスパラギン酸；ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケタラン硫酸、デキストラン硫酸等の硫酸化多糖類；およびこれらの薬理上許容される塩を挙げることができる。薬理上許容される塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩等を挙げることができる。これら安定化剤は、二種類以上を組み合わせ用いてもよい。好ましい安定化剤としては、アルギニン、リジン、デキストラン硫酸ナトリウム等を挙げることができる。安定化剤の添加量は、HGFの保存安定性を達成できる量であれば特に制限はされないが、好ましくはHGFの重量に対して0.01～100 倍の重量であり、特に好ましくは0.1～30倍の重量が挙げられる。

【0017】

緩衝剤としては、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液のpHを調整し、HGFの溶解性を保つ作用を有するものであれば特に限定されないが、例えば、リン酸バッファー、クエン酸バッファー、酢酸バッファーなどを用いることができる。緩衝剤として、好ましくは、ほぼ中性のpH領域で緩衝能を有するリン酸バッファーを用いることができ、特に好ましくはリン酸ナトリウムバッファーを用いることができる。緩衝剤の添加量は、例えば、再溶解後の水量に対して1～100 mM程度である。

【0018】

塩化ナトリウムは、凍結乾燥前及び再溶解後の水溶液においてHGFの溶解性を向上させるが、必要以上に添加すると浸透圧を高めるので好ましくない。一般的には、生体と等張となるような浸透圧を達成できる量を添加すればよく、特に注射剤の浸透圧比として許容される浸透圧比1～2が好ましく、例えば再溶解後の水量に対して140 mMとすることが好ましい。

【0019】

本発明のHGF凍結乾燥製剤には、さらに界面活性剤を添加することが望ましい。HGFは容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすく、特に低濃度においてはHGFの容器への吸着は投与薬液中の薬物含量の低下につながる。界面活性剤を添加することによって、再溶解後のHGFの容器への吸着を防止することができる。界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-40、HCO-60、プルロニックF-68、ポリエチレングリコール等の非イオン性界面活性剤を挙げることができ、これらを二種以上組み合わせて用いてもよい。界面活性剤として特に好ましくは、ポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤（ポリソルベート80等）を用いることができる。界面活性剤の添加量は、例えば、再溶解後の水重量に対して0.001～2.0%の範囲である。

【0020】

本発明のHGF凍結乾燥製剤は、HGFを含有する水溶液を通常の方法で凍結乾燥することにより製造できる。例えば、HGF、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を注射用蒸留水に溶解し、必要に応じて界面活性剤を添加した後、濾過滅菌してバイアル瓶又はアンプル等の容器に分注して凍結乾燥することができる。本発明のHGF凍結乾燥製剤は、製剤化に必要な他の添加剤、例えば、酸化防止剤、防腐剤、賦形剤、無痛化剤などを含んでいてもよい。凍結乾燥方法としては、例えば、（1）常圧下で冷却凍結する凍結過程、（2）溶質に拘束されない自由水を減圧下で昇華乾燥する一次乾燥過程、（3）溶質固有の吸着水や結晶水を除去する2次乾燥過程の3つの単位操作による方法が挙げられるが（Pharm. Tech. Japan, 8(1), 75-87, 1992）、本発明の凍結乾燥製剤の製造方法はこの方法に限定されることはない。本発明の凍結乾燥製剤は、使用に際して、HGF濃度が5 mg/mL以下となるように注射用蒸留水などの溶媒を加えて溶解すればよい。

【0021】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

例1：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリン酸緩衝液

(pH 6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。なお、表中→は、温度を変化させたことを示す。

【0022】

【表 1】

	凍結過程		一次乾燥過程		二次乾燥過程	
温度 (°C)	20 → -40	-40	-40 → -20	-20	-20 → 20	20
時間 (Hr)	1	5	3	48	2	24
圧力 (mmHg)	760	760	<1	<1	<1	<1

【0023】

例 2：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に HGF 5 mg/mL となるように加温溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0024】

例 3：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に HGF 10 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0025】

例 4：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF

F 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0026】

例 5：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5% グリシン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液（pH 5.0）に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0027】

例 6：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（比較例）

300 mM 塩化ナトリウム、5% アラニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する 10 mM クエン酸緩衝液（pH 5.0）に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後に、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、表 1 に示す条件に従って凍結乾燥して、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0028】

例 7：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニンを含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。この製剤は使用時に 2 mL の注射用蒸留水に溶解することにより HGF を 1 mg/mL 含有し、ほぼ中性 pH で許容される浸透圧比（1.5；ほぼ等張）を有する注射液とすることができた。

【0029】

例 8：低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM 塩化ナトリウム、100 mM アルギニン、0.01% ポリソルベート 80 を含有する

10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に HGF 1 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0030】

例 9 : 低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

140 mM塩化ナトリウム、100 mMアルギニン、0.01%ポリソルベート80を含有する 10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に HGF 2 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0031】

例10 : 低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

140 mM塩化ナトリウム、100 mMアルギニン、0.01%ポリソルベート80を含有する 10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に HGF 5 mg/mL となるように溶解し、無菌濾過した後に HGF 水溶液を得た。本水溶液の pH を調整した後、無菌的にバイアル瓶に 2 mL ずつ充填し、例 1 の凍結乾燥の条件と同様の条件により低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0032】

例11 : 低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

例 8 において、10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) の代わりに 10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0033】

例12 : 低濃度 HGF 凍結乾燥製剤の作製 (本発明)

例 8 において、10 mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) の代わりに 10 mMリン酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて、HGF 1 mg/mL となるように溶解し、低濃度 HGF 凍結乾燥製剤を得た。

【0034】

例13：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、10 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）の代わりに10 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）を用いて、HGF 1 mg/mLとなるように溶解し、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0035】

例14：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、10 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）の代わりに10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）を用いて、HGF 1 mg/mLとなるように溶解し、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0036】

例15：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、100 mMアルギニンの代わりに50 mMアルギニンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0037】

例16：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにリジンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0038】

例17：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにヒスチジンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0039】

例18：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにグルタミンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【0040】

例19：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにシステインを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 1 】

実施例20：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

実施例8において、アルギニンの代わりにプロリンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 2 】

例21：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにグルタミン酸ナトリウムを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 3 】

例22：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにアスパラギン酸ナトリウムを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 4 】

例23：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、アルギニンの代わりにグリシンを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 5 】

例24：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

例8において、バイアル瓶への充填量2 mLの代わりに5 mLを用いて、低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 6 】

例25：低濃度HGF凍結乾燥製剤の作製（本発明）

140 mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）にデキストラン硫酸ナトリウム50 mg/mLとなるように溶解した後に、HGF 1 mg/mLとなるように溶解した。続いて、pHを調整して、HGF水溶液を得た。次いで、バイアル充填し、例1の凍結乾燥条件と同様な条件により低濃度HGF凍結乾燥製剤を得た。

【 0 0 4 7 】

試験例1：HGFの溶解度に関する評価

(1) HGF の溶解度の評価方法

HGF をポリプロピレン製チューブに秤量し、種々の濃度の塩化ナトリウムおよび安定化剤、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリン酸ナトリウム緩衝液を添加後、直ちにチューブを一定温度に24時間保持し、HGF を溶解した。溶解後直ちに遠心分離 (15,000rpm、10分間、一定温度) を行い、HGF 飽和溶液と未溶解HGF を完全に分離し、上清をサンプリングした。低タンパク吸着性フィルター; ミリポアGV (親水性デュラポア; $0.22\mu\text{m}$) で濾過し、得られた飽和溶液中のHGF濃度をHPLC法 (ゲル濾過法) により定量し、HGF の飽和溶解度を求めた。

【0048】

HPLCによる分析条件

カラム; TOSOH TSK G-3000SWXL ($\phi 0.78 \times 30\text{cm}$)流速; 0.3 ml/min

検出波長; OD 280nm

温度; 30°C キャリアー; 0.3 M NaCl , $50\text{ mM Phosphate Na}$, 0.1% SDS, pH7.5アプライ; $50\mu\text{l}$ HGF の保持時間; 24.0 min

【0049】

(2) HGF の溶解度におよぼす pH の影響

140 mM 塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリン酸ナトリウム緩衝液で、pHの異なる溶液を調製し、 4°C および 20°C におけるHGFの溶解度を(1)の方法で検討し、その結果を表2に示した。pHの低下に伴いHGFの溶解度は徐々に増加し、pH5.0以下で顕著な溶解度の向上が確認された。また、いずれの場合も温度上昇に依存した溶解度の増加を認めた。

【0050】

【表 2】

	20℃	4℃
pH 7.5	0.8	0.4
pH 7.0	1.8	1.0
pH 6.0	2.3	1.3
pH 5.0	5.9	4.2

(HGFの溶解度を mg/mL で示した)

【0051】

(3) HGFの溶解度におよぼす塩化ナトリウム濃度の影響

種々の濃度の塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) を調製し、4℃および20℃におけるHGF溶解度を(1)の方法で検討し、その結果を表3に示した。塩化ナトリウム濃度を上昇させるにしたがって、HGFの顕著な溶解度の増加を認めた。また、いずれの場合にも、温度上昇に依存したHGFの溶解度の増加を認めた。

【0052】

【表 3】

	20℃	4℃
無添加	0.3	0.1
+140 mM NaCl	0.8	0.4
+230 mM NaCl	3.2	1.4
+300 mM NaCl	8.5	4.0
+900 mM NaCl	>190	—

(HGFの溶解度を mg/mL で示した)

【0053】

(4) HGFの溶解度におよぼす各種安定化剤の影響

各種医薬品添加剤のHGF溶解度におよぼす影響について検討した。種々の濃度の添加剤、140 mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10 mMリ

ン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8～7.5）に、HGF 1 mg/mLとなるように溶解し、HGF水溶液を得た。96穴マイクロタイタープレートに各ウェルあたり200 μ l ずつ分注し、4℃にて48時間保存した後、プレートリーダーにてOD 450 nmを測定しHGF水溶液の濁度を求めた。HGFの溶解度が低下し、HGFが凝集・沈澱するにともない溶液の濁度が上昇した。

【0054】

添加物として、アミノ酸20種類（アルギニン、リジン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、バリン）、糖類7種類（マンニトール、果糖、トレハロース、ブドウ糖、ソルビトール、ショ糖、乳糖）、高分子類3種類（デキストラン硫酸ナトリウム、デキストラン、PEG）、タンパク質類3種類（HSA、酸性ゼラチン、塩基性ゼラチン）、界面活性剤4種類（ポリソルベート80、ポリソルベート20、HCO-40、HCO-60）についてHGFの溶解度におよぼす影響を評価したところ、下記の物質にHGFの溶解度を保持する安定化作用が認められた。

【0055】

アミノ酸類；アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウム、グルタミン、システイン、プロリン（0.05 Mで効果が確認された）、及び多糖類：デキストラン硫酸ナトリウム（0.1%で効果が確認された）。顕著な効果が認められたアミノ酸について、種々の濃度のアミノ酸、140 mM塩化ナトリウム、0.01%ポリソルベート80を含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を調製し、4℃におけるHGFの溶解度を(1)の方法で検討し、その結果を表4に示した。

【0056】

【表 4】

		飽和溶解度	浸透圧比
添加剤なし		1. 0	1. 0
+ L - A r g	5 0 mM	7. 3	1. 3
+ L - L y s	5 0 mM	4. 5	1. 3
+ L - H i s	5 0 mM	3. 2	1. 2
+ L - G l u N a	5 0 mM	2. 2	1. 3
+ L - A r g	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L - L y s	1 0 0 mM	> 1 0	1. 6
+ L - H i s	1 0 0 mM	4. 8	1. 4
+ L - G l u N a	1 0 0 mM	3. 2	1. 6

(H G F の溶解度を mg/mL で示した)

【0 0 5 7】

【発明の効果】

本発明の凍結乾燥製剤から調製される H G F 水溶液は、注射剤として許容される pH および浸透圧比を有しており、沈殿や白濁などが生じないので、長期間の保存が可能である。H G F は病態モデルにおいて 0.01 ~ 0.1 mg/kg/day 程度の濃度で強い薬効が認められ、また凍結乾燥製剤 1 容器（バイアル、アンプル等）が通常 1 回の用量であるため、本発明の凍結乾燥製剤から調製される H G F 水溶液は、臨床的に十分な治療効果を発揮できる H G F を含有している。また、本発明の凍結乾燥製剤はケーキ形成性に優れており、凍結乾燥製剤としての長期保存安定性にも優れ、再溶解も極めて容易であるという特徴がある。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 注射剤として望ましい特性を有し、沈殿や白濁などが生じない水溶液を調製可能な肝実質細胞増殖因子の凍結乾燥製剤を提供する。

【解決手段】 肝実質細胞増殖因子、安定化剤、塩化ナトリウム、及び緩衝剤を含有する凍結乾燥製剤であって、肝実質細胞増殖因子を 5 mg/mL以下の濃度で含有し、注射剤として望ましい pH（例えば 6.0 から 7.0 の範囲）及び浸透圧を有する水溶液を調製するための製剤。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社